

Patent and Trade Marks Committee  
of Russian Federation

(19) RU (11) 2106785 (13) C1  
(51)  
6 A 23 C 9/15, 9/152, 21/08

**(12) DESCRIPTION OF INVENTION**  
**to the patent of the Russian Federation**

NIIGPE  
FUND  
OF EXPERTS

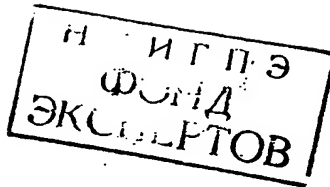
1.  
(21) 93056598/13 (22) 23.12.93  
(31) 358929/92  
(32) 25.12.92  
(33) JP  
(46) 20.03.98 Bull. No 8  
(72) Josikazu Yuki (JP), Kumiko Tarazava (JP) Tamoyo Nakagava (JP) Kaxuo Kato (JP)  
(71) (73) DCR Pharnasuiticala Co., Ltd. (JP)  
(56) SU certificate of authorship, 300156, cl. A 23 C 9.206 1971.  
(54) METHOD OF PRODUCTION OF PRODUCT, CONTAINING ACTIVE MILK-PROTEIN COMPONENTS, AND PRODUCT, PRODUCED BY THIS METHOD (VARIANTS).

**FORMULA OF INVENTION**

1. The method of production of the product, containing active milk-protein components, which stipulates the thermal treatment of the milk base at 60°C, addition in the base of the additive with obtaining of the mixture, which is *distinguished* by the fact that the defatted milk and/or milk whey is used as the milk base, and the thermal treatment is executed after addition of the additive at pH = 6 - 8 during 10 hours, the saccharic alcohol or disaccharide or the stabilizer, consisting of disaccharide and amino-acid is used as the additive.
2. The method according to the paragraph 1, which is *distinguished* by the fact that after the thermal treatment pH of the mixture is brought to 4 - 7 and then ammonium sulfate is added in amount of 30 - 60 % of weight/volume; after that the obtained precipitate is separated.
3. The method according to the paragraph 1 or 2, which is *distinguished* by the fact that the saccharic alcohol or disaccharide, or disaccharide with amino-acid are added to the milk whey in individual concentrations of 40 - 70 % of volume/volume or 10 - 20 % of volume/volume.
4. The method according to the paragraph 2, which is *distinguished* by the fact that the saccharic alcohol is the sorbit and the disaccharide is the cane-sugar, and amino-acid is glycine.
5. The method according to the paragraph 1 or 2, which is *distinguished* by the fact that the milk whey is the whey of the human breast milk or the cow milk.
6. The product, which includes the milk base and the additives, which is *distinguished* by the fact that the defatted milk and/or milk whey are used as the milk base and the saccharic alcohol or disaccharide or stabilizer, made of disaccharide and amino-acid is used as the additive, the milk base is mixed with the additives and are treated at pH = 6 - 8, temperature 60°C during 10 hours.
7. The product, which includes the milk base and the additives, which is *distinguished* by the fact that the defatted milk and/or milk whey are used as the milk base and the

**BEST AVAILABLE COPY**

saccharic alcohol or disaccharide or stabilizer, made of disaccharide and amino-acid is used as the additive, the milk base is mixed with the additives and are treated at pH = 6 - 8, temperature 60°C during 10 hours, and then pH of the mixture is brought to 4 - 7 and the ammonium sulfate if added to the mixture in amount of 30 - 60 % of volume/volume.



(19) RU (11) 2106785 (13) C1

(51) 6 A 23 C 9/15, 9/152, 21/08

Комитет Российской Федерации  
по патентам и товарным знакам

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**  
к патенту Российской Федерации

1

- (21) 93056598/13 (22) 23.12.93  
(31) 358929/92  
(32) 25.12.92  
(33) JP  
(46) 20.03.98 Бюл. № 8  
(72) Йосиказу Юки(JP), Кумико Тераза-  
ва(JP), Томойо Накагава(JP), Казуо Ка-  
то(JP)  
(71) (73) Джи-Си-Ар Фармасьютикалз Ко.,  
Лтд. (JP)  
(56) SU, авторское свидетельство, 300156,  
кл. А 23 С 9/20, 1971.  
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТА,  
СОДЕРЖАЩЕГО АКТИВНЫЕ МОЛОЧНО-  
БЕЛКОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ, И ПРО-  
ДУКТ, ПОЛУЧЕННЫЙ ЭТИМ  
СПОСОБОМ (ВАРИАНТЫ)  
(57) Использование: настоящее изобретение  
обеспечивает получение продуктов, содер-  
жащих активные молочные белковые ком-

2

поненты, которые сохраняют иммуноглобу-  
лины и другие активные белковые компо-  
ненты, содержащиеся в сыром молоке,  
таком как человеческое грудное молоко  
или коровье молоко, и содержат любые  
вирусы инаktivированными. Сущность изо-  
бретения: способ включает стадии добавле-  
ния к обезжиренному молоку или  
молочной сыворотке сахарного спирта, или  
дисахарида, или стабилизатора, состоящего  
из дисахарида и аминокислоты, и проведе-  
ния термообработки полученной в резуль-  
тате смеси при pH 6 - 8 при примерно  
60°C в течение примерно 10 ч, одной или  
в сочетании с дополнительной стадией  
прибавления сульфата аммония к смеси  
при pH 6 - 8 при концентрации от 30 до  
60% (мас./объем) для извлечения получен-  
ного в результате осадка. 3 с. и 4 з.п.ф-  
лы, 5 табл.

RU 2106785 C1

RU 2106785 C1

Настоящее изобретение относится к не содержащим вирусов продуктам, содержащим активные молочные компоненты, которые получают при нагревании, например, человеческого грудного молока /здесь далее кратко упоминается как "грудное молоко"/ или других видов молока в таких условиях, что могут сохраняться активности полезных активных белковых компонентов, имеющих в нем, таких как иммуноглобулины, лактоферрин и лизоцим, не вызывая какого-либо их разрушения, и к способу их получения.

Хотя прогресс в лечении недоношенных детей сделал возможным значительно увеличить количество выживших недоношенных и преждевременных детей, еще остается нерешенной проблема выкармливания недоношенных детей. Недоношенных детей в настоящее время выкармливают главным образом материнским молоком, но при их неадекватном усвоении питания и быстром росте они имеют тенденцию страдать от серьезного недостатка питания, главным образом в отношении белка и минеральных веществ, что приводит в результате к значительному беспокойству о возможном вредном воздействии на их последующий рост и развитие. Для дополнения питательными элементами были сделаны попытки, в основном в Европе, использовать укрепленное материнское молоко, в которое добавлены питательные элементы, дефицитные в материнском молоке /Goldblum R.M. et al., *Pediatric Research* 25, 184, /1989/, Hagelberg S. et al., *Acta Paediatr. Scand* 79, 1163, /1990//. В качестве укрепляющих веществ для материнского молока могут быть упомянуты витамины, минеральные вещества и сахара, а также белковые компоненты, содержащиеся в коровьем молоке или в грудном молоке.

Например, укрепление компонентами грудного молока считается важным с точки зрения полного питания и соответствия иммунности, и сообщалось, что грудное молоко, дополненное такими компонентами, было получено в лабораторных масштабах для испытаний, и когда его давали преждевременно родившимся или недоношенным детям, увеличивалась масса тела, подавлялся понос или снижалась встречаемость некротического колита /Howie P.W. et al., *Br. Med. J.* 300, 11 /1990/, Moro G.E. et al., *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr* 13, 150 /1991/, Lucas A. et al., *The Lancet*, 336, 1519 /1990//.

В случае грудного молока, особенно сборного грудного молока, серьезной проблемой явля-

ется противовирусная обработка против загрязнения вирусом СПИДа и другими патогенными вирусами. Стерилизующая обработка компонентов такого молока в настоящее время осуществляется только с помощью термообработки в течение короткого периода времени, или антивирусную обработку таких компонентов проводят только с помощью инактивирующей обработки при 56°C в течение 30 мин. Сообщалось, что в описанных выше условиях вирус СПИДа должен инактивироваться /Eglin R.P. et al., *The Lancet*, 9 мая, 1093 /1987//, но сильное заражение вирусом СПИДа рассматривается как далекое от полной инактивации /Raskin L. et al., *JAMA* 225/.

В качестве надежной процедуры очистки от патогенных вирусов, которая была оценена в свете изучения настоящих стандартов, пригодна термообработка в жидком состоянии при 60°C в течение 10 ч. /здесь далее упоминается как "нагрев в жидком состоянии"/, исходя из сообщения Murray /*The New York Academy of Medicine* 31, 341 (1985)/, и она интенсивно использовалась в течение продолжительного периода времени. Однако процедура применима только к веществам, способным выдерживать нагрев в жидком состоянии, таким как альбумины; процедура вызывает термическую денатурацию активных белковых компонентов грудного молока, таких как секреторные иммуноглобулины, лактоферрин и лизоцим, при 62,5°C в течение 30 мин, приводя к пониженным активностям или полной дезактивации /Evans T.J. et al., *Archives of Disease in Childhood* 58, 239 /1978//. Настоящими изобретателями было показано, что секреторный иммуноглобулин А в виде очищенного из грудного молока остается стабильным даже после того, как его подвергали нагреву в жидком состоянии при 60°C в течение 10 ч /японская выложенная заявка N 145031 /1992/, но был сделан ряд тщетных попыток решить нерешенную проблему термообработки в отношении лактоферрина, лизоцима и т.п., которые являются другими полезными активными белковыми компонентами при защите живого организма против инфекции.

Известный способ получения сухой питательной смеси для детей /по а.с. СССР N 300156, кл. А 23 С 9/20. 1971/ предусматривает обработку молочной основы при 60°C и введение в нее таких добавок, как жир и жирорастворимые витамины. При раскрытом способе термообработки активные белковые компоненты молока денатурируются и деак-

тивируются, что снижает ценность полученного продукта.

Таким образом, известный способ не решает задачу создания такой термообработки, которая, с одной стороны, обеспечила бы безопасность для детей путем полного уничтожения любых патогенных микроорганизмов, и, с другой стороны, обеспечивала бы сохранение активности иммунологически и физиологически важных белковых факторов, таких как S - IgA, лизоцим, трансферин и т.п. Это особенно важно для питания преждевременно рожденных или иммунно ослабленных младенцев, или младенцев, имевших очень малый вес при рождении.

Как известно, недоношенные младенцы очень часто поражаются такими заболеваниями, как анемия, инфекции, колиты, нарушения метаболизма /кишечные газы/ и т.д., а выходят из этих состояний с большим трудом. В свете изложенного огромное значение имеет дополнительное питание таких младенцев смесями, усиленными активными молочными белками. В частности, такой белок как лактоферин действует в качестве носителя железа и необходим для нормального эритропоэза крови, а различные иммунологические факторы, такие как S - IgA или лизоцим, тесно вовлечены в иммунные процессы, проходящие в организме, и способны обеспечить иммунопотенцирующий эффект.

Настоящее изобретение решает поставленную задачу благодаря тому, что, как было неожиданно обнаружено авторами изобретения, десятичасовая тепловая обработка молочной основы при 60°C в присутствии соответствующим образом подобранного стабилизатора может обеспечить сохранение активных молочных белков, и в результате в концентрированной смеси эти белки остаются в нативном состоянии, как в сыром молоке, при этом обеспечивая полную стерилизацию продукта.

После интенсивного исследования промышленного или коммерческого способа получения описанных выше белковых активных компонентов, содержащихся в молоке, настоящее изобретение обнаружило, что можно получать активные белковые компоненты с повышенной безопасностью и эффективностью при проведении нагрева в жидком состоянии обезжиренного молока в условиях нейтрального pH при последующем совместном использовании обессоливания в слабокислых условиях, и это открытие явилось кульминацией настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к продуктам, содержащим активные белковые компоненты молока, которые получают по способу, состоящему из стадий добавления к молочной плазме или сыворотке сахарного спирта, или дисахарида, или стабилизатора, состоящего из дисахаридов и аминокислоты, и проведения термообработки полученной в результате смеси при pH 6 - 8 при примерно 60°C в течение около 10 ч.; продукты, содержащие активные компоненты молочного белка, которые представляют собой осадок, образовавшийся при добавлении сульфата аммония в концентрации от 30 до 60% /мас./объем/ к термообработанной смеси, приготовленной при добавлении к молочной сыворотке сахарного спирта, или дисахарида, или стабилизатора, состоящего из дисахарида и аминокислоты, с последующей термообработкой полученной в результате смеси при pH 6 - 8 при температуре около 60°C в течение около 10 ч.; и к способам их получения.

В настоящем изобретении применяют молочную плазму или молочную сыворотку от молока животных, такого как человеческое молоко и коровье молоко. Как хорошо известно, жидкое молоко обезжиривают, чтобы получить молочную плазму, которую затем лишают казеина, чтобы получить молочную сыворотку.

В настоящем изобретении молочную плазму или молочную сыворотку нагревают при примерно 60°C в течение около 10 ч. в присутствии добавленного стабилизирующего агента для инактивации вирусов.

Добавление стабилизирующего агента является наиболее важным не только для предохранения молочной жидкости от помутнения во время нагрева, но также для подавления денатурации для дезактивации активных белковых компонентов, содержащихся в молочной жидкости, таких как секреторный иммуноглобулин, лактоферрин, и лизоцим.

Термин "активные белковые компоненты", как он использован в настоящем изобретении, означает любой белок, который в минимальных количествах проявляет физиологические и фармакологические свойства.

В качестве стабилизирующего агента используют сахарные спирты, такие как сорбит и маннит, и дисахариды, такие как тростниковый сахар и солодовый сахар, одни или в смеси с аминокислотами, такими как глицин и аланин.

Применяют один или не более двух стабилизирующих агентов, и в случае, когда

их используют по одному, предпочтительно использовать сахарные спирты, которые не вызывают какой-либо реакции коричневого окрашивания, такие как сорбит.

Хотя желательно использовать стабилизирующие агенты при более высоких концентрациях, рекомендуется для повышения эффективности обессоливания после термообработки использовать аминокислоты при соотношении от 10 до 20% /мас./объем/, тогда как сахарные спирты или дисахарады применяют в пропорциях от 20 до 70% /мас./объем/.

Согласно японской выкладке N 145031/1992, принадлежащей настоящим изобретателям, секреторный иммуноглобулин А подвергают нагреву в жидком состоянии при температуре около 60°C в течение примерно 10 ч в присутствии того же самого стабилизирующего агента, в результате чего нет необходимости упоминать о величине pH раствора. Интенсивное исследование привело настоящих исследователей к открытию того факта, что при обработке совместно и исчерпывающе нескольких активных белковых компонентов в молочной жидкости путем нагрева в жидком состоянии, согласно настоящему изобретению величина pH раствора, смешанного со стабилизирующим агентом, имеет первостепенное значение. В интервале кислого pH лактоферрин и лизоцим являются стабильными, тогда как секреторный иммуноглобулин А становится мутным и подвергается полимеризации, являясь восприимчивым к денатурации. В интервале щелочного pH, с другой стороны, лактоферрин и лизоцим становятся нестабильными. Настоящее изобретение было успешно выполнено на основе обнаружения единственного условия, что нагревание осуществляют при pH вблизи нейтральной точки /pH 6 - 8/, это условие позволяет получить эти полезные активные белковые компоненты путем извлечения исчерпывающим и стабильным образом.

На полиовирусе типа I было показано как на модельном вирусе, что вирусы действительно инактивируются при проведении нагрева в жидком состоянии молочной жидкости при pH 7,0 при 60°C в течение 10 ч. в присутствии 65% сорбита, эти условия охватываются условиями термообработки настоящего изобретения /табл. 1/. Результаты подтверждают, что нагрев в жидком состоянии в присутствии стабилизатора согласно настоящему изобретению приведет в результате к инаktivации вируса СПИДа и цитомегаловируса, которые индивидуально показывают термическую устой-

чивость, меньшую или равную таковой у полиовируса.

Активные белковые компоненты в термообработанном молочном растворе могут быть извлечены при высаливании сульфатом аммония. Для достижения этого рекомендуется использовать при термообработке молочную сыворотку, предварительно лишенную казеина. Принимая во внимание повышенную концентрацию стабилизирующего агента, содержащегося в термообработанном молочном растворе, активные белковые компоненты извлекают с помощью процедуры осаждения, желательно при разбавлении термообработанного молочного раствора равным или двойным объемом воды для понижения его вязкости. В этом случае, процедура извлечения, когда ее проводят в интервале кислого pH или при pH 4 - 6, может быть осуществлена с наилучшей степенью извлечения активных белковых компонентов.

Осаждение полиэтиленгликолем, как применено настоящими изобретателями в открытой выкладке японской заявки на патент N 145031/1992 для извлечения иммуноглобулинов, может позволить извлечь высокомолекулярный секреторный иммуноглобулин и лактоферрин из грудного молока, но выпадают из извлечения лизоцим и другие компоненты, которые имеют более низкие молекулярные массы /табл. 2/.

Термообработанная молочная сыворотка настоящего изобретения при введении соответствующего типа стабилизирующего агента в подходящей концентрации может быть подана как таковая или в смеси с водой или другим пищевыми продуктами в виде свободной от вирусов пищи. Активные белковые компоненты как фракционированные из термообработанной молочной сыворотки могут быть обессолены с помощью диализа или ультрафильтрации, стерилизованы и поданы в жидком виде или после смешивания с лиофилизированным грудным молоком или молочными препаратами для недоношенных детей или обычным порошковым молоком.

Молоко и другие пищевые продукты, которые смешивают с компонентами грудного молока настоящего изобретения, содержащими только активные белковые компоненты, включая иммуноглобулины, могут быть использованы в качестве добавок к грудному молоку и питания для недоношенных детей, а также для предотвращения заражения вирусами и при терапии неподдающегося поноса, и можно ожидать, что они найдут более широкое применение не только в

качестве пищи, но и в качестве фармацевтических продуктов.

Ниже приводятся примеры и примеры испытаний для более детальной иллюстрации настоящего изобретения.

#### Пример 1.

Обезжиривают на центрифуге порцию 5 л грудного молока и полученную в результате надосадочную жидкость устанавливают на рН 4,6, потом удаляют казеин путем центрифугирования, чтобы получить надосадочную жидкость /молочную сыворотку/. Устанавливают рН молочной сыворотки равным 7,0 и смешивают для растворения с сорбитом в пропорции 65% /мас./объем/, и растворенную смесь распределяют в прочные стеклянные бутылки, затем укупоривают на воздухе. Стеклянные бутылки погружают в горячую воду при 60°C, нагревают содержимое в течение 10 ч, затем охлаждают при добавлении двукратного объема холодной воды, устанавливают рН 5,0 и смешивают с сульфатом аммония до концентрации 50% /объем/объем/ для проведения высаливания. Выпавшую в осадок фракцию собирают центрифугированием и растворяют в изотоническом солевом растворе, и раствор подвергают адекватному диализу с использованием диализующей мембраны и отделением фракции с мол. м. 3000, поток стерилизуют с помощью мембранной фильтрации. Количество извлеченного белка /контролируется по поглощению при длине волны 280 нм/ составляет 75%, считая на молочную сыворотку /группа N HW-1/. Проводят ту же самую процедуру одновременно, но без термообработки для получения контроля /группы N NW-1/.

#### Пример 2.

Обезжиривают порцию 5 л человеческого грудного молока с помощью центрифугирования и устанавливают рН полученного раствора /молочной сыворотки/ равным 7,0 и смешивают для растворения с сорбитом и глицином при концентрации 50% /мас./объем/ и 15% /мас./объем/ соответственно, потом распределяют в прочные стеклянные бутылки и укупоривают на воздухе. Стеклянные бутылки погружают в теплую воду при 60°C для нагревания содержимого в течение 10 ч., затем охлаждают при добавлении двукратного объема воды, устанавливают рН 5,0 и смешивают с сульфатом аммония при концентрации 50% /мас./объем/ для проведения высаливания. Осажденную фракцию собирают центрифугированием и растворяют в изотоническом солевом растворе, полученный в результате раствор подвергают адекватному диализу с исполь-

зованием диализующей мембраны с отсечением фракции с мол. м. 1000, потом стерилизуют с помощью мембранной фильтрации. Количество извлеченного белка /контролируемого по поглощению при длине волны 260 нм/ составляет 72%, считая на молочную сыворотку /Группа N HW-2/. Повторяют ту же самую процедуру одновременно, но без термообработки, чтобы получить контроль /Группа N HW-2/.

#### Тестовый пример 1.

Белковые компоненты грудного молока, полученные в примере 1, очищают на хроматографической колонке на ионообменной смоле DEAE-Toyorearl, чтобы получить секреторный иммуноглобулин А /сIgA/. сIgA, полученный из группы N HW-1, будет называться "Грудная N Н - сIgA", тогда как иммуноглобулин, полученный из Группы N HW - 1, называют "Группа N - сIgA". Эти тестовые образцы, а также белковые компоненты грудного молока, приготовленные в примерах 1 и 2, подвергали измерению величины нейтрализации антител с использованием Коксакии вирусов, группа В, тип 3, группа А тип 4 и группа А тип 16. Результаты приведены в табл. 3.

Наблюдается, что белковые компоненты грудного молока согласно настоящему изобретению, Группа NN HW - 1 и HW - 2 сIgA, выделенный из Группы HW - 1, Группа N Н - сIgA, показывают одинаковые величины вирусной нейтрализации антител с любыми Коксакии вирусами как для белковых компонентов из нетермообработанного грудного молока, Группы NNNW - 1 и NW - 2, так и сIgA, выделенного из Группы N NW - 1, Группа N Н - сIgA. Такие результаты показывают, что очищенные сIgA сохраняют свой распознающий вирус паратоп без денатурации даже после термообработки.

#### Тестовый пример 2.

Белковые компоненты грудного молока, полученные в примере 1, очищают с помощью аффинной колоночной хроматографии на сульфированном Целлюлофайне, получают лактоферрин. Очищенный лактоферрин из Группы N HW - 1 упоминается как "Группа N Н - Lf", тогда как лактоферрин из Группы N NW - 1 называют "Группа NN - Lf". Эти тестовые образцы, а также белковые компоненты грудного молока, полученные в примерах 1 и 2, подвергают определению способности к объединению железа, результаты показаны в табл. 4.

Белковые компоненты грудного молока настоящего изобретения, Группы NN HW - 1 и HW - 2, а также лактоферрин,

выделенный из Группы N NW - 1 группа N H - Lf, как было обнаружено, обладают способностью объединяться с примерно 1,5 молекулами железа на молекулу, как в случае с белковыми компонентами грудного молока, не подвергавшегося термообработке, Группы NN NW-1 и NW - 2, и лактоферрин, выделенный из Группы N NW - 1, группы N N - Lf". Поскольку хорошо известно, что лактоферрин имеет 2 сайта связывания с железом в молекуле, результаты свидетельствуют, что лактоферрин, выделенный из белковых компонентов грудного молока, остается с неизменными сайтами связывания железа даже после термообработки.

#### Тестовый пример 3.

Белковые компоненты грудного молока, полученные в примерах 1 и 2, подвергают изменению ферментной активности лизоцима, результаты приведены в табл. 5.

Наблюдалось, что белковые компоненты грудного молока согласно настоящему изобретению, Группы NN NW - 1 и NW - 2, оба показывают ферментную активность лизоцима, подобную нетермообработанным белковым компонентам грудного молока Группы NN NW - 1 и NW - 2. Результаты показывают, что лизоцим, содержащийся в белковых компонентах, сохраняет свои связывающие субстрат центры и активные центры как незатронутые даже после термообработки. /Процедура анализа/.

сIgA анализировали в соответствии с методом ЭЛАЙЗА, в котором использовали антитела антисекторного компонента /полученные К.К.Игаку Сейбутугаку Кенкиуу-шо/ в качестве твердой фазы и меченые пероксидазой анти- $\alpha$ -цепные антитела, полученные из анти- $\alpha$ -цепных антител/полученных Сейкагаку Когю К.К./, потом использовали метод Хашида /J. Appl. Biochem., 6, 56/1984// в качестве меченого

антитела. Стандартный сIgA, как использовали, был приготовлен настоящими изобретателями. Величину вирусной инфекции и величину нейтрализации антител вируса рассчитывали на основании эффектов дегенерации вирусных клеток, найденных на микроплатах с использованием вирусных пролиферируемых клеток и установленной клеточной линии MA 104 поперечного происхождения из резус обезьян /Uirus Jikken-gaku Soron / Studies on Virus Experiments, Elements, Maruzen Ltd of Toryo, Japan /1973//.

Лактоферрин анализировали в соответствии с методом ЭЛАЙЗА, в котором были использованы анти-лактоферрин антитела в качестве твердой фазы и меченые пероксидазой антитела /полученные Джексон Иммунорисерч Лаб./ в качестве меченого антитела. В качестве стандарта был использован лактоферрин /производимый Сигма Ко/.

Способность лактоферрина соединяться с железом была определена в соответствии с методом Мапуриера с сотр. /Biochimica et Biophysica Acta 629, 399/1980//.

Активность лизоцима анализировали по способу снижения мутности для клеток *Micrococcus luteus*.

/Стандарты для ингредиентов для фармацевтических продуктов вне области Японской фармакопей/. В качестве стандарта использовали лизоцим яичного белка.

Согласно настоящему изобретению обезжиренная молочная жидкость может быть подвергнута термообработке без разрушения или денатурации активных белковых компонентов, содержащихся в молоке, или последующему дополнительному извлечению таких активных белковых компонентов для обеспечения продуктов, которые могут использоваться без риска вирусного заражения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения продукта, содержащего активные молочно-белковые компоненты, предусматривающий тепловую обработку молочной основы при 60°C, введение в молочную основу добавки с получением смеси, *отличающийся* тем, что в качестве молочной основы используют обезжиренное молоко и/или молочную сыворотку, а тепловую обработку ведут после введения добавки при pH 6 - 8 в течение 10 ч, причем в качестве добавки используют сахарный спирт или дисахарид, или стабилизатор, состоящий из дисахарида и аминокислоты.

2. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что после тепловой обработки pH смеси доводят до 4 - 7 и в смесь дополнительно вносят сульфат аммония в количестве 30 - 60 вес./об.%, после чего отделяют полученный преципитат.

3. Способ по п.1 или 2, *отличающийся* тем, что сахарный спирт или дисахарид, или дисахарид с аминокислотой добавляют к молочной сыворотке в индивидуальных концентрациях 40 - 70 об./об.% или 10 - 20 об./об.%.

4. Способ по п.2, *отличающийся* тем, что сахарным спиртом является сорбит, а



дисахаридом является тростниковый сахар, при этом аминокислотой является глицин.

5. Способ по п.1 или 2, *отличающийся* тем, что молочной сывороткой является сыворотка грудного человеческого молока или коровьего молока.

6. Продукт, включающий молочную основу и добавки, *отличающийся* тем, что в качестве молочной основы используют обезжиренное молоко и/или молочную сыворотку, а в качестве добавки - сахарный спирт или дисахарид, или стабилизатор из дисахарида и аминокислоты, при этом молочную основу смешивают с добавками и подвергают тепловой обработке при pH 6 - 8, температуре 60°C в течение 10 ч.

7. Продукт, включающий молочную основу и добавки, *отличающийся* тем, что в качестве молочной основы используют обезжиренное молоко и/или молочную сыворотку, а в качестве добавки - сахарный спирт или дисахарид, или стабилизатор из дисахарида и аминокислоты, при этом молочную основу смешивают с добавками и подвергают тепловой обработке при pH 6 - 8, температуре 60°C в течение 10 ч, а затем pH смеси доводят до 4 - 7 и в смесь дополнительно вносят сульфат аммония в количестве 30 - 60 вес./об.%.

Таблица 1

Инактивация полиовируса с помощью нагрева в жидком состоянии  
с Полио вирусом типа 1, разбавленным фосфатным буфером PBS/pH 7,2

Стабилизатор	Нагрев в жидком состоянии 60°C/10 ч/ТСИД <sub>50</sub>	Нагрев 4 °C/10 ч/ТСИД <sub>50</sub>
1	2	3
Нет	3,1	$3,2 \cdot 10^4$
65% сорбита	3,1	$3,2 \cdot 10^4$
65% сорбита + X*	3,1	$5,6 \cdot 10^4$

Примечание: \* 2% человеческий сывороточный альбумин, который прибавляют в качестве модельного белка при рассмотрении возможности, чтобы сам белок действовал как стабилизатор для вируса.

Таблица 2

Извлеченное количество белкового компонента из грудного молока

Белковый компонент грудного молока	Высаливание /NH <sub>4</sub> / <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *	Осаждение полиэтиленгликолем *
сИгА	74,2%	65,2%
Лактоферрин	70,1%	35,7%
Лизоцим	69,2%	1%

Примечание: \* Молочная сыворотка из той же самой партии была подвергнута нагреванию в жидком состоянии настоящего изобретения, разбавлена водой и утановлено pH 5,0, потом разделяют на две порции равного объема, одну из которых затем высаливали сульфатом аммония, а другую подвергали извлечению путем осаждения 25% полиэтиленгликоля.

Таблица 3

Величины вирусной нейтрализации антител белковых компонентов грудного молока и сИгА, выраженные в терминах максимального разбавления 5 мг/мл сИгА, требующегося для нейтрализации 100 ТСИД<sub>50</sub> для каждого вируса /концентрация сИгА рассчитана на основе метода ЭЛАЙЗА/

Вирус	Компоненты грудного молока *				Очищенный сИгА **	
	NW-1	HW-1	NW-2	HW-2	N-сИгА	H-сИгА
1	2	3	4	5	6	7
Коксакки В3	4	4	8	8	8	8
Коксакки А4	16	32	4	4	16	16
Коксакки А16	32	32	8	8	32	32

Примечание: \* Компоненты грудного молока, NW-1 и HW-1, а также NW-2 и HW-2 были получены из одного и того же грудного молока, термообработка была проведена для HW-1 и HW-2, но не проводилась для NW-1 и NW-2.

\*\* Очищенные сИгА и N-сИгА и H-сИгА были в виде изолированных из грудного молока компонентов, NW-1 и HW-1.

Таблица 4

Способность к связыванию железа компонентов грудного молока и лактоферрина, выраженная в терминах количества связанных молекул железа

Компонент грудного молока *				Очищенный лактоферрин **	
NW-1	HW-1	NW-2	HW-2	N-Lf	H-Lf
1,5	1,7	1,5	1,6	1,5	1,4

Примечание: \* Компоненты грудного молока, NW-1 и HW-1, а также NW-2 и HW-2 были получены из одного и того же грудного молока, тепловая обработка проводилась для HW-1 и HW-2, но не проводилась для NW-1 и NW-2.


\*\* Очищенные лактоферрины, N-Lf и H-Lf были изолированы в виде компонентов грудного молока, NW-1 и HW-1,

Таблица 5

Лизоцимная активность компонентов грудного молока, рассчитанная как превращенный в количественный титр лизоцим яичного белка и выраженная в терминах количественного титра, мкг, на поглощение, измеренное в ячейке 10 мм при длине волны 280 нм

Компонент грудного молока *			
NW-1	HW-1	NW-2	HW-2
28,9	27,9	31,7	30,5

Примечание: \* Компоненты грудного молока, NW-1 и HW-1, а также NW-2 и HW-2 были получены из одного и того же грудного молока, с термообработкой для HW-1 и HW-2, но без проведения термообработки для NW-1 и NW-2.

Заказ  Подписное  
ВНИИПИ, Рег. ЛР № 040720  
113834, ГСП, Москва, Раушская наб., 4/5

121873, Москва, Бережковская наб., 24 стр. 2.  
Производственное предприятие «Патент»

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**